

1304 / 52127

ČESKÁ REPUBLIKA

REC'D 24 SEP 2004

WIPO

PCT

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

potvrzuje, že

ÚSTAV MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE AV ČR, Praha, CZ

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, Praha, CZ

podal(i) dne 16.7.2003

příhlášku vynálezu značky spisu PV 2003-1950

a že připojené přílohy se shodují úplně  
s původně podanými přílohami této přihlášky.



Za předsedu: Ing. Jan Mrva



ze dne 10.8.2004

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Reaktivní polymery a kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, způsob jejich přípravy a jejich použití pro syntézu polymerních léčiv, pro modifikaci biologicky aktivních proteinů a přípravu systémů pro dopravu genů.

### Oblast techniky

Vynález se týká nových reaktivních polymerů a kopolymerů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, jejich přípravy a použití pro přípravu polymerních léčiv umožňujících cílenou terapii a pro modifikaci biologicky aktivních proteinů ("protein delivery") a přípravu systémů pro genovou terapii.

### Dosavadní stav techniky

Vývoj nových léčiv a lékových forem se v posledních letech stále více zaměřuje na využití polymerních látek, zvláště vodorozpuštěných polymerů jako nosičů léčiv. Významnou skupinu polymerních léčiv zaznamenávajících rychlý vývoj tvoří léčiva připravená na bázi kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA). V takovém polymerním léčivu je léčivo vázáno k polymernímu nosiči přes enzymaticky štěpitelnou oligopeptidovou sekvenci umožňující řízené uvolňování aktivního cytostatika v cílových (nádorových) buňkách. Tato léčiva často využívají protilátku jako jednotku specificky směřující léčivo k vybraným orgánům či buňkám. Struktura, syntéza a vlastnosti takovýchto konjugátů jsou popsány v patentech (CZ 278551 - J. Kopeček, P. Rejmanová, J. Strohalm, R. Duncan, J. B. Lloyd, K. Ulbrich, B. Říhová, V. Chytrý; USP 5,571,785 -F. Angelucci, M. Grandi, A. Suarato) [1,2] a řadě dalších publikací (K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation: J. Controlled Release 64, 2000, 63-79; B. Říhová, M. Jelínková, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, O. Hovorka, M. Novák, D. Plundrová, Y. Germano, K. Ulbrich, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules II. Anticancer activity of antibody or (Fab')<sub>2</sub>-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators: J. Controlled Release 64 (2000) 241-261; J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. R. Lu, HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000) 61-81; K. Ulbrich, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, R. Duncan, B. Říhová, Polymeric Conjugates of Drugs and Antibodies for Site-Specific Drug Delivery, Macromol. Symp. 103 (1996) 177-192). [3-6].

Přehled dosud dosažených výsledků je dobře dokumentován v práci Kopeček a spol.: HPMACopolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 61-81 [5]. Některé polymerní konjugáty jsou v současné době klinicky testovány (P. A. Vasey, R. Duncan, S.B.Kaye, J.Cassidy, Clinical phase I trial of PK1 (HPMA co-polymer doxorubicin), *Eur. J. Cancer* 31 (1995) S193, P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: First member of a new class of chemotherapeutic agents - Drug-polymer conjugates, *Clinical Cancer Research* 5 (1999) 83-94, P. J. Julyan, L. W. Seymour, D. R. Ferry, S. Daryani, C. M. Boivin, J. Doran, M. David, D. Anderson, C. Christodoulou, A. M. Young, Preliminary clinical study of the distribution of HPMACopolymers bearing doxorubicin and galactosamine, *J. Controlled Release* 57 (1999) 281-290, A. H. Thomson, P. A. Vasey, L. S. Murray, J. Cassidy, D. Fraier, E. Frigerio, C. Twelves, Population pharmacokinetics in phase I drug development: a phase I study of PK1 in patients with solid tumours: *Br. J. Cancer* 81 (1999) 99-108. L.W. Seymour, D.R.Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P.J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A.M. Young, S. Burtles, D.J. Kerr, Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J.Clin. Oncol.* 20, 1668-1676, 2002; N.V.R. Panday, M.J.M. Terwogt, W.W. Huinink et al., Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU 166945, a novel water-soluble prodrug of paclitaxel. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17,742, 1998; M.J.M. Terwogt, W.W. Huinink, J.H.M. Schellens, M. Schot, I.A.M. Mandjes, M.G. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F.J. Koopman, J.H.Beijnen: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU 166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 12, 315-323, 2001; M. Bouma, B. Nuijen, D.R. Stewart, J.R. Rice, B.A.J. Jansen, J. Reedijk, A. Bult, J.H. Beijnen, Stability and compatibility of the investigational polymer-conjugated platinum anticancer agent AP 5280 in infusion systems and its hemolytic potential. *Anti-Cancer Drugs* 13, 915-924, 2002; M.M. Tibben, J.M. Rademaker-Lakhai, J.R. Rice, D.R. Stewart, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, Determination of total platinum in plasma and plasma ultrafiltrate, from subjects dosed with the platinum-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer AP5280, by use of graphite-furnace Zeeman atomic-absorption spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 373, 233-236, 2002) [7-15]. Ve fázi předklinického testování jsou v současné době polymerní cytostatika obsahující jako směrující jednotku lidský IgG (B.Říhová, J. Strohalm, K. Kubáčková, M. Jelínková, L. Rozprimová, M. Šírová, D. Plocová, T. Mrkvan, M. Kovář, J. Pokorná, T. Etrych, K. Ulbrich,

Drug-HPMA-HuIg conjugates effective against human solid cancer: Adv. Exp. Med. Biol. 519 (2003) 125-143). [16].

Výsledky klinického testování ukázaly, že například polymerní léčivo na bázi doxorubicinu (Dox) je účinné a méně nespecificky toxické než volné léčivo. Maximální tolerovaná dávka pro PK1 (MTD) je  $320 \text{ mg/m}^2$  což je 4-5 x více, nežli je v klinice používaná dávka volného doxorubicinu ( $60\text{--}80 \text{ mg/m}^2$ ), MYD pro PK2 je  $120 \text{ mg/m}^2$ . Na rozdíl od doxorubicinu nebyly při aplikaci polymerního léčiva pozorovány žádné závažné změny srdečních funkcí, ačkoliv kumulativní dávka dosáhla hodnoty  $1680 \text{ mg/m}^2$ .

Současná syntéza polymerních léčiv na bázi kopolymerů HPMA prováděná podle postupu popsáném v CZ patentu 278551 [1] a řadě dalších prací je poměrně složitá a skládá se z několika kroků, jako je syntéza HPMA, monomerů obsahujících reaktivní esterové skupiny (4-nitrofenylové či sukcinimidové estery), přípravy kopolymerů obsahujících v postranním řetězci 4-nitrofenylové (ONp) nebo sukcinimidové (OSu) estery (polymerní prekurzory), vazby léčiva, případně směřující jednotky k polymernímu nosiči a čištění a charakterizace polymerního léčiva. Příprava reaktivních polymerních prekurzorů s 4-nitrofenylovými reaktivními skupinami se provádí srážecí kopolymerizací HPMA s 4-nitrofenylovými estery *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů v acetonu při  $50^\circ\text{C}$  po dobu 24 hod. Dosažená konverze se pohybuje v rozmezí 55–60 %. Polymerace je provázena inhibiční periodou a probíhajícími přenosovými reakcemi. To brání jednoduchým způsobem (koncentrací iniciátoru či monomeru nebo teplotou) řídit molekulovou hmotnost a tedy i vlastnosti polymerního prekurzoru. Vazba léčiva a směřující jednotky (protilátky) je založena na aminolytické reakci polymerních ONp esterů primárními aminoskupinami obsaženými v molekule léčiva nebo směřující jednotky za vzniku amidické vazby.

Vzhledem ke srovnatelné rychlosti aminolýzy a hydrolýzy polymerních ONp esterů ve vodném prostředí je vazba kancerostatika například doxorubicinu, případně další biologicky aktivní molekuly či směřující jednotky (galaktosamin) (CZ patent 278551) [1] prováděna v organickém rozpouštědle dimethylsulfoxidu (DMSO) a izolace finálního produktu je prováděna vysrážením do značného objemu srážedla (aceton : diethylether 3:1) a následující filtrací. Konjugáty obsahující jako směřující jednotku glykoproteiny (protilátky) jsou připravovány dvoustupňovým procesem, přičemž je nejdříve navázáno v organickém rozpouštědle (DMSO, DMF) léčivo například doxorubicin a po izolaci konjugátu s léčivem obsahujícím část nezreagovaných ONp esterů srážením, jsou protilátky vázány aminolyticky

ve vodném roztoku při konstantním pH v rozmezí 8,0-8,2 udržovaném přidavkem tetraboritanu sodného (K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation: J. Controlled Release 64, 2000, 63-79) [3].

Stejným způsobem jsou modifikovány rozpustnými polymery na bázi kopolymerů HPMA i další biologicky aktivní proteiny či oligopeptidy (enzymy jako BS RNáza, RNáza A, cyklosporin A, lecirelin (K. Ulbrich, J. Strohalm, D. Plocová, D. Oupický, V. Šubr, J. Souček, P. Poučková, J. Matoušek, Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine seminal ribonuclease. Synthesis, physicochemical and biological properties: J. Bioactive Compat. Polym. 15 (2000) 4-26; J. Souček, P. Poučková, M. Zadinová, D. Hloušková, D. Plocová, J. Strohalm, Z. Hrkál, T. Oleár, K. Ulbrich, Polymer conjugated bovine seminal ribonuclease inhibits growth of solid tumors and development of metastases in mice: Neoplasma 48 (2001) 127-132; J. Souček, P. Poučková, J. Strohalm, D. Plocová, D. Hloušková, M. Zadinová, K. Ulbrich, Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) inhibit growth of human melanoma in nude mice: J. Drug Targeting 10 (2002) 175-183; B. Říhová, A. Jegorov, J. Strohalm, V. Mařha, P. Rossmann, L. Fornůsek, K. Ulbrich, Antibody-Targeted Cyclosporin A: J. Controlled Release 19 (1992) 25-39; K. Ulbrich, V. Šubr, J. Lidický, L. Sedlák, J. Pícha, Polymerní konjugáty lecirelinu s protražovaným účinkem a jejich použití, CZ patent 288 568 (2001)) [17-21] či polyelektrolytové DNA (nebo plasmidové) komplexy (K. D. Fisher, Y. Stallwood, N. K. Green, K. Ulbrich, V. Mautner, L.W. Seymour, Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies: Gene Ther. 8 (2001) 341-348) [22].

Všechny tyto syntézy vedou k hydrolýze části ONp nebo OSu esterových skupin polymeru a tím i ke snížení schopnosti polymeru reagovat s proteinem, případně další biologicky aktivní látkou, a vedou k produktu, jehož struktura je komplikovaná a obtížně definovatelná.

Cílem předloženého vynálezu je poskytnout nové jednoduše připravitelné reaktivní polymery a kopolymery HPMA, obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny pro syntézu polymerních léčiv, modifikaci biologicky aktivních proteinů a přípravu systémů pro dopravu genů.

#### Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou reaktivní polymery a kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu pro přípravu polymerních léčiv, modifikaci biologicky aktivních proteinů a přípravu systémů pro dopravu genů, jejichž podstata spočívá v tom, že obsahují reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny. Tyto reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny se mohou podle vynálezu nacházet na postranních řetězcích polymeru či kopolymeru nebo na konci polymerního řetězce.

Přednostní provedení podle vynálezu představují reaktivní kopolymery sestávající z 30 až 3000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, z nichž 60 až 99,8 % jednotek je *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid a 0,2 až 40 % je reaktivních monomerních jednotek na bázi *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny, obecného vzorce Ma-X-TT, kde X je aminokyselina nebo oligopeptid, přičemž aminokyselina je vybraná ze skupiny zahrnující kyselinu  $\epsilon$ -aminokapronovou, kyselinu 4-amino-benzoovou a  $\beta$ -alanin a oligopeptid je vybraný ze skupiny zahrnující GlyGly, GlyPhe, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, GlyLeuPheGly.

Dalším význakem předloženého vynálezu jsou reaktivní polymery sestávající z 20 až 150 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného ze 100 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, a nesoucího na konci řetězce sulfanylpropionyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.

Předložený vynález dále zahrnuje reaktivní polymery sestávající z 20 až 150 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného z 95 % až 99,90 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a 0,1 až 5 % *N*-methakryloylovaných oligopeptidů doxorubicinu, přičemž oligopeptidy jsou s výhodou vybrané ze skupiny GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyLeuLeuGly, a nesoucího na konci řetězce sulfanylpropionyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.

Dalším přednostním provedením vynálezu jsou reaktivní polymery sestávající z 20 až 2000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného ze 100 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, a nesoucího na konci řetězce kyanovaleeroyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.

Význakem vynálezu jsou dále reaktivní kopolymery sestávající z 20 až 2000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného z 95 až 99,9 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a 0,1 až 5 % jednotek *N*-methakryloylovaných oligopeptidů doxorubicinu, přičemž oligopeptidy jsou s výhodou vybrané ze skupiny GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyLeuLeuGly, a nesoucího na konci řetězce kvanovaleroyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.

Předložený vynález dále zahrnuje reaktivní monomerní jednotky na bázi *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny obecného vzorce Ma-X-TT, kde X je aminokyselina nebo oligopeptid, přičemž aminokyselina je vybraná ze skupiny zahrnující kyselinu  $\epsilon$ -aminokapronovou, kyselinu 4-amino-benzoovou a  $\beta$ -alanin, oligopeptid je s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující GlyGly, GlyPhe, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a kde TT představuje thiazolidin-2-thionovou skupinu, vhodné pro přípravu reaktivních polymerů.

Způsob přípravy reaktivních polymerů a kopolymerů podle vynálezu spočívá v tom, že se monomery vybrané ze skupiny, sestávající z *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a *N*-methakryloylované aminokyseliny nebo oligopeptidu obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny podrobí roztokové radikálové polymerizaci.

Význakem vynálezu je dále způsob přípravy reaktivních polymerů a kopolymerů podle vynálezu jež spočívá v tom, že se monomer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid podrobí radikálové srážecí polymeraci za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče či azo-bis-kvanovalerové kyseliny jako iniciátoru a získaný polymer se nechá zreagovat s 2-thiazolin-2-thiolem.

Reaktivní kopolymery podle vynálezu lze připravit způsobem, který spočívá v tom, že se monomer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid podrobí radikálové roztokové kopolymeraci s *N*-methakryloylovaným oligopeptidem doxorubicinu za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče či azo-bis-kvanovalerové kyseliny jako iniciátoru a získaný polymer se nechá zreagovat s 2-thiazolin-2-thiolem.

Předložený vynález dále zahrnuje použití reaktivních polymerů a kopolymerů podle vynálezu pro přípravu polymerních konjugátů obsahujících léčivo jako doxorubicin nebo daunomycin a použití reaktivních kopolymerů pro přípravu konjugátů obsahujících ligand pro receptor na cílové buňce, např. glykoproteiny Ig, IgG, hIgG nebo monoklonální protilátku pro terapeutické účely.

Významem vynálezu je dále použití reaktivních polymerů podle vynálezu pro přípravu hydrofilním polymerem modifikovaných (koutovaných) polymerních komplexů (polyplexů) DNA plasmidů nebo adenovirů jako systémů pro dopravu genů.

Předmětem vynálezu jsou reaktivní polymery (polymerní prekurzory) připravené na bázi kopolymerů HPMA s methakryloylovanými substituovanými amidy, obsahujícími reaktivní thiazolidin-2-thionové (TT) skupiny, jejich syntéza a použití pro přípravu polymerních léčiv a konjugátů s proteiny pro terapeutické účely. Záměna ONp skupiny v HPMA kopolymerech za reaktivní TT skupinu přináší významné zlepšení, zjednodušení a zlevnění celého postupu přípravy polymerních léčiv na bázi kopolymerů HPMA i konjugátů těchto polymerů s biologicky aktivními proteiny a oligopeptidy. Přípravu polymerních prekurzorů obsahujících reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny (TT polymery) v postranních řetězcích je možné s výhodou provádět roztokovou polymerizací v dimethylsulfoxidu. Vlivem vyšší polymerizační rychlosti je možné dosáhnout 70 - 80 % konverze již po 7 hod polymerace (u polymerních ONp esterů je možné dosáhnout konverze 50 - 60 % až za 24 hod). Požadovaná molekulová hmotnost polymerního prekurzoru není ovlivňována obsahem reaktivního komonomeru jako v případě ONp esterů a je řízena jak koncentrací monomeru a iniciátoru, tak i polymerační teplotou v širokém rozmezí molekulových hmotností.

Příprava semitelechelických poly(HPMA) prekurzorů obsahujících reaktivní thiazolidin-2-thionovou skupinu (TT polymery) na konci polymerního řetězce probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku jsou připraveny semitelechelické poly(HPMA) obsahující koncové karboxylové skupiny srážecí radikálovou polymerací v acetonu při 50 °C prováděnou po dobu 24 h za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče (K Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation: J. Controlled Release 64 , 2000, 63-79) [3] nebo radikálovou srážecí polymerací v acetonu při 50 °C po dobu 24 hod za použití azo-bis-kyanovalerové kyseliny jako iniciátoru (T. Etrych, J.



Strohalm, K. Ulbrich, M. Jelínková, B. Říhová, Targeting of Polymer-drug Conjugates with Antibodies. Effect of the Method of Conjugation: 5th International Symposium On Polymer Therapeutics, Cardiff, Great Britain, 2002, Abstracts, p. 65) [24]. Následnou reakci koncové karboxylové skupiny s 2-thiazolin-2-thiolem v přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v *N,N*-dimethylformamidu (DMF) je připraven reaktivní polymerní prekurzor.

Semitelechelické HPMA-Dox polymerní prekurzory, obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionovou skupinu (TT polymery) na konci polymerního řetězce a doxorubicin v postranním řetězci, lze připravit roztokovou radikálovou kopolymerací HPMA a *N*-methakryloylovaných oligopeptidů doxorubicinu (GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyLeuLeuGly) v methanolu při 50 °C probíhající po dobu 24 h za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče [3] nebo radikálovou roztokovou kopolymerací výše uvedených komonomerů v methanolu při 50 °C po dobu 24 hod za použití azo-bis-kyanovalekové kyseliny jako iniciátoru [24] a následnou reakcí koncové karboxylové skupiny s 2-thiazolin-2-thiolem v přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v DMF.

Polymerní prekurzory podle vynálezu, obsahující reaktivní TT skupiny, se vyznačují značným rozdílem mezi rychlostí aminolýzy a hydrolýzy ve vodném prostředí (obr.1), což umožňuje provádět vazbu léčiv i biologicky aktivních látek v jednom reakčním kroku. Navíc ve vodném prostředí je možné provádět celý proces, t.j. včetně vazby léčiva, což vede ke značnému zjednodušení a zlevnění přípravy polymerních cytostatik i konjugátů polymeru s proteiny. Vyloučení použití velkých objemů hořlavin (diethylether, aceton) při syntéze se projeví nejen nižšími výrobními náklady, ale i jednoduššími podmínkami pro zajištění bezpečnosti výroby preparátu a projeví se i šetrností k životnímu prostředí. Porovnání přípravy polymerních konjugátů je schematicky znázorněno na obr. 2. Obr. 1 dokumentuje, že při aminolytické reakci vazby léčiva či proteinu bude přednostně a velmi rychle docházet k vazbě těchto látek (aminolýze) na polymer a nežádoucí vedlejší reakce hydrolýzy bude silně potlačena.

#### Přehled obrázků

Na obr. 1 je znázorněné porovnání rychlosti hydrolýzy a aminolýzy kopolymerů P-Akap-TT a P-GlyGly-ONp v HEPES pufru při pH 8,0, ♦ P-Akap-TT hydrolýza, ◇ P-Akap-TT aminolýza, ▲ P-GlyGly-ONp hydrolýza, Δ P-GlyGly-ONp aminolýza. Na obr. 2 jsou porovnány jednotlivé kroky při syntéze polymerních konjugátů obsahujících léčivo a glykoprotein z výchozích monomerních surovin HPMA a *N*-methakryloylovaných aminokyselin a

oligopeptidů obsahujících reaktivní TT a ONp skupiny. Na obr. 3 je znázorněna aktivita klasického a hvězdicového konjugátu BS-RNázy při léčbě lidského melanomu v nu-nu myších. Obr. 4 ukazuje dobu přežití pokusných myší v terapeutickém modu podání konjugátů připravených podle příkladů 5 a 6 předloženého vynálezu. Na obrázcích 5 a 6 jsou znázorněny obecné struktury reaktivních sloučenin podle předmětného vynálezu, kde struktura I představuje monomer obecného vzorce Ma-X-TT, struktura II kopolymery s reaktivními thiazolidin-2-thionovými skupinami v bočním řetězci, struktury III a V polymery s reaktivními skupinami na konci řetězce a struktury IV a VI kopolymery s reaktivními skupinami na konci řetězce. Obr. 7 ukazuje struktury sloučenin připravitelných za použití reaktivních polymerů podle vynálezu, přičemž struktura VII znázorňuje příklad nesměrovaného polymerního kancerostatika a struktura VIII příklad protilátkou směrovaného kancerostatika.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení, kde jsou uvedeny příklady přípravy reaktivních monomerů, syntézy reaktivních polymerů tj. polymerních prekurzorů za použití reaktivních monomerů a také příklady použití těchto polymerních prekurzorů pro přípravu polymerního léčiva či konjugátu aniž je na ně omezen.

#### Příklady provedení

##### Příprava polymerních prekurzorů

Příprava reaktivních polymerů se provádí ve dvou syntetických krocích. V prvním se připraví monomery - *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA) a *N*-methakryloylované aminokyseliny a oligopeptidy obsahující thiazolidin-2-thionové reaktivní skupiny (Ma-X-TT, Struktura I, obr. 5). V druhém kroku se připraví výsledné reaktivní polymery radikálovou kopolymerizací HPMA s Ma-X-TT (X je oligopeptid nebo aminokyselina).

##### Příklad 1

Reaktivní TT kopolymer s nedegradovatelnou spojkou tvořenou  $\epsilon$ -aminokapronovou kyselinou (P-Akap-TT) (Struktura II, obr. 5)

HPMA byl připraven dříve popsanou metodou [3]. *N*-Methakryloyl- $\epsilon$ -aminokapronová kyselina byla připravena methakryloylací  $\epsilon$ -aminokapronové kyseliny reakcí dle Schotten-

Baumana [23]. *N*-methakryloyl- $\epsilon$ -aminokapronová kyselina (3.0 g, 0.015 mol) a 2-thiazolin-2-thiol (1.8g, 0.015 mol) byly rozpuštěny v 35 ml octanu ethylnatého. Dicyklohexylkarbodiimid (DCCI) (3.72g, 0.018 mol) byl rozpuštěn v 5 ml octanu ethylnatého. Oba roztoky byly ochlazeny na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ochlazené roztoky byly smíchány a udržovány 1 hod při  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a dále přes noc při  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakční směs byla míchána 1 hod při teplotě místnosti s přidavkem 0,1 ml kyseliny octové. Vyloučená dicyklohexylmočovina (DCU) byla odfiltrována. Roztok byl vakuově zahuštěn a opět naředěn octanem ethylnatým. Další část vyloučené dicyklohexylmočoviny (DCU) byla odfiltrována. Produkt byl krystalován ze směsi octan ethylnatý – diethylether  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Produkt byl odfiltrován, promyt diethyletherem a sušen ve vakuu.

Výsledný polymer byl připraven radikálovou kopolymerizací. 1 g směsi HPMA (95 %mol, 0,90 g) a Ma-Akap-TT (5 %mol, 0,10 g) a 0,133 g azo-bis-isobutyronitrilu bylo rozpuštěno v 5,53 g dimethylsulfoxidu (DMSO) a roztok byl předložen do polymerační ampule. Po probulání polymerační směsi dusíkem byla ampule zatavena a polymerace prováděna při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 6 hod. Polymer byl izolován vysrážením do 100 ml směsi aceton- diethylether 1 : 1. Polymer byl odfiltrován, promyt acetonem a diethyletherem a sušen za vakua. Molekulová hmotnost tohoto polymeru byla  $M_w = 32\,400$ ,  $M_w/M_n = 1.65$  a obsah TT skupin byl 3.9 mol%. Složení kopolymeru (obsah postranních řetězců zakončených TT reaktivními skupinami) je možné řídit složením polymerizační směsi v širokém rozsahu, molekulovou hmotnost je možné řídit koncentrací iniciátoru a monomeru v násadě i teplotou polymerace.

## Příklad 2

Reaktivní TT kopolymer se spojkou tvořenou biodegradovatelnou tetrapeptidovou sekvencí (P-Gly-DL-PheLeuGly-TT, P-Gly-L-PheLeuGly-TT) (Struktura II, obr. 5)

HPMA a oba komonomery (*N*-methakryloyl-glycyl-fenylalanylleucylglycin lišící se konfigurací fenylalaninu (L; D,L)) byly připraveny dříve popsánymi metodami [3]. Oba *N*-methakryloyl-glycyl-fenylalanylleucylglycin-thiazolidin-2-thiony (Ma-Gly-L-PheLeuGly-TT, Ma-Gly-DL-PheLeuGly-TT) byly připraveny reakcí kyseliny s 2-thiazolin-2-thiolem v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu (DCCI). Ma-Gly-PheLeuGly-OH (2.0 g, 0,00434 mol) a 2-thiazolin-2-thiol (0.544 g, 0,00456 mol) byly rozpuštěny ve 12 ml *N,N*-dimethylformamidu (DMF). DCCI (1.06 g, 0,00514 mol) byl rozpuštěn v 5 ml DMF. Roztoky

byly ochlazený na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a smíchány dohromady. Reakční směs byla udržována 1 hod při  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a dále po 48 hod při  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakční směs byla míchána 1 hod při teplotě místnosti za přídavku 0,1 ml kyseliny octové. Vyloučená DCU byla odfiltrována a filtrát byl vakuově zahuštěn. Olejovitý zbytek byl naředěn acetonem, vpadlý zbytek DCU byl odfiltrován. Produkt byl vyčištěn na silikagelové koloně ve směsi rozpuštědel octan ethylnatý : aceton v poměru 3 : 1. Frakce odpovídající produktu byla jímána, rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno k suchu. Produkt byl rozmíchán s diethyletherem, odfiltrován a usušen. Kopolymerizace HPMA s jednotlivými reaktivními komonomery byla prováděna za stejných podmínek, jako v případě kopolymeru s Akap spojkou. Molekulová hmotnost tohoto polymeru byla  $M_w = 33\,100$ ,  $M_w/M_n = 1.63$  obsah TT skupin byl 8.22 mol%. Složení kopolymeru (obsah postranních řetězců zakončených TT reaktivními skupinami) je možné i v tomto případě řídit složením polymerizační směsi v širokém rozsahu, molekulovou hmotnost je možné řídit koncentrací iniciátoru a monomeru v násadě i teplotou polymerace.

Obdobným způsobem byly připraveny i kopolymery s TT skupinami připojenými k polymeru spojkami tvořenými glycinem, diglycinem a  $\beta$ -alaninem. V těchto případech byly výchozími surovinami HPMA a Ma-Gly-OH, Ma-Gly-Gly-OH a Ma- $\beta$ -Ala-OH. Postupy syntézy byly analogické s přípravou P-Akap-TT.

### Příklad 3

Příprava semitelechelických HPMA polymerů obsahujících koncovou thiazolidin-2-thionovou reaktivní skupinu.

A. Semitelechelické poly(HPMA), obsahující koncové karboxylové skupiny, byly připraveny srážecí radikálovou polymerací v acetonu při  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  prováděnou po dobu 24 h za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče [3] nebo radikálovou srážecí polymerací v acetonu při  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hod za použití azo-bis-kyanovalekové kyseliny jako iniciátoru [24].

1 g semitelechelického poly(HPMA) obsahující koncové karboxylové skupiny ( $M_n = 5000$ , 0,0002 mol karboxylových skupin) byl rozpuštěn v 10 ml DMF a k roztoku byl přidán 2-thiazolin-2-thiol (0,238 g, 0,002 mol) a DCCI (0,413 g, 0,002 mol). Reakční směs byla míchána 24 hod při teplotě místnosti. Reakční směs byla vakuově zahuštěna na koncentraci 15 % hmotn. polymeru. Reaktivní polymer byl izolován vysrážením do směsi aceton : diethylether 1:1. Polymer byl odfiltrován, promyt acetonem, rozpuštěn v methanolu a izolován srážením do

směsi aceton : diethylether 3:1. Polymer byl odfiltrován, promyt diethyletherem a sušen za vakua. (Struktury III a V, obr. 5).

B. Semitelechelické HPMA-Dox kopolymery, obsahující koncové karboxylové skupiny, byly připraveny roztokovou radikálovou kopolymerací HPMA a *N*-methakryloyl-glycylphenylalanylleucylglycyldoxorubicinu v methanolu při 50 °C probíhající po dobu 24 h za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče [3] nebo radikálovou roztokovou kopolymerací výše uvedených komonomerů v methanolu při 50 °C po dobu 24 hod za použití azo-bis-kyanovalekové kyseliny jako iniciátoru [24].

1 g semitelechelického polymeru HPMA-Dox obsahující koncové karboxylové skupiny ( $M_n = 5000$ , 0,0002 mol karboxylových skupin) byl rozpuštěn v 10 ml DMF a k roztoku byl přidán 2-thiazolin-2-thiol (0,238 g, 0,002 mol) a DCCI (0,413 g, 0,002 mol). Reakční směs byla míchána 24 hod při teplotě místnosti. Reakční směs byla vakuově zahuštěna na koncentraci 15 % hmotn. polymeru. Reaktivní polymer byl izolován vysrážením do směsi aceton : diethylether 1:1. Polymer byl odfiltrován, promyt acetonem, rozpuštěn v methanolu a izolován srážením do směsi aceton : diethylether 3:1. Polymer byl odfiltrován, promyt diethyl etherem a sušen za vakua. (Struktura IV, obr. 5 a struktura VI, obr.6).

#### Příklad 4

Příprava nasměrovaného polymerního kancerostatika s doxorubicinem v DMSO

Kopolymer P-GlyPheLeuGly-TT (Struktura II) (0,15 g) byl rozpuštěn v 0,85 ml DMSO a k roztoku bylo přidáno 0,016 g Dox.HCl a dále 0,003 ml triethylaminu. Po 1 hod míchání bylo přidáno dalších 0,0012 ml  $\text{Et}_3\text{N}$  a reakční směs byla míchána další 1 hod. Zbylé, nezreagované TT skupiny byly odstraněny přidávkem 0,002 ml 1-amino-2-propanolu a polymer byl izolován vysrážením do směsi aceton - diethylether 3:1. Polymer byl odfiltrován a přečištěn přes kolonu plněnou Sephadexem LH-20 v methanolu. Obsah navázaného Dox byl 6.79 % hmotn. (Struktura VII, obr. 7).

#### Příklad 5

### Příprava nesměrovaného polymerního kancerostatika s doxorubicinem ve vodě

Kopolymer P-GlyPheLeuGly-TT (0,15 g) byl rozpuštěn v 1,5 ml destilované vody a k roztoku bylo přidáno 0,016 g Dox.HCl. Reakční směs byla míchána 2 hod při teplotě místnosti a pH roztoku bylo udržováno pomocí pH-statru na hodnotě 8,2 přidavkem nasyceného roztoku tetraboritanu sodného. Zbylé, nezreagované TT skupiny byly odstraněny přidavkem 0,002 ml 1-amino-2-propanolu a pH bylo upraveno na 6,5. Finální produkt byl přečištěn přes kolonu plněnou Sephadexem G-25 ve vodě a lyofilizován. Obsah navázaného Dox byl 6,51 % hmotn..

#### Příklad 6

Příprava klasického protilátkou směrovaného polymerního kancerostatika s doxorubicinem (Struktura VIII, obr. 7)

Kopolymer P-GlyPheLeuGly-TT (0,1 g, 8,22 %mol TT skupin) byl rozpuštěn přímo v 5,0 ml Adriablastiny (Adriablastina CZ, Pharmacia-Upjohn, léková forma Dox.HCl, 2 mg Dox/ml 0,15 M NaCl) a pak bylo přidáno 35 mg hIgG (Intraglobin F, Biotest GmbH) v 1,87 ml destilované vody. Pomocí pH-statru bylo upraveno pH z počátečních 5,0 na 8,0 přidavkem tetraboritanu sodného a bylo na této hodnotě udržováno 1,5 hod pak bylo zvýšeno na 8,2 po následující 4,5 hod. Pak bylo přidáno 0,002 ml 1-amino-2-propanolu a pH bylo upraveno na 6,5. Finální produkt byl přečištěn přes kolonu plněnou Sephadexem G-25 ve vodě a lyofilizován. Konjugát obsahoval 4,3 % hmotn. Dox a 29,7 % hmotn. hIgG. Mol. hmotnost  $M_w$  konjugátu byla 885 000.

#### Příklad 7

Příprava hvězdicového protilátkou směrovaného polymerního kancerostatika s doxorubicinem

Pro přípravu hvězdicového cytostatika na bázi kopolymeru HPMA byl použit semitelechelický kopolymer nesoucí v postranních řetězcích Dox, připravený podle příkladu 3 B. Reakce polymeru s protilátkou byla prováděna podle postupu uvedeného pro syntézu hvězdicového konjugátu vycházejícího ze semitelechelického ONp esteru [3]. Reakce byly prováděny při různém poměru polymeru a protilátky ve výchozí směsi a tím bylo řízeno i složení produktu (obsah protilátek v konečném léčivu a molekulová váha produktu). Ačkoli obě reakce vedou k

velmi podobným produktům (obsah Dox v konjugátu 4-5 % hmotn.,  $M_w \sim 500\,000$ ), reakce vycházející z TT HPMA kopolymeru vedla k vyšším výtěžkům a menšímu obsahu nezreagovaného (hydrolyzovaného) polymeru v reakční směsi na konci reakce. To umožňuje přesněji nastavit stupeň substituce protilátky polymerem jednoduše změnou poměru navážek obou komponent vstupujících do reakce. Rovněž čištění produktu od nezreagovaného polymeru je pak jednodušší.

#### Příklad 8

Příprava klasického konjugátu kopolymeru HPMA s hovězí pankreatickou RNázou (RNázou A)

Klasický konjugát byl připraven reakcí polymeru připraveného podle příkladu 2 (P-Gly-DL-PheLeuGly-TT) s RNázou A za stejných podmínek, jak je uvedeno v [3]. Obsah RNázy A v polymerním konjugátu byl stanoven pomocí aminokyselinové analýzy (LDC-Analytical, kolona s reverzní fází Nucleosil 120-3 C<sub>18</sub> Macherey Nagel, OPA derivatizace [3], čistota byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou (gradientový gel 10-15 Phastsystem (Pharmacia LKB) a konjugát charakterizován pomocí GPC (Superose 4B/6B; 0.05 M Tris pufr pH 8.0). Vlastnosti konjugátu byly porovnány s vlastnostmi konjugátu připraveného z klasického ONp reaktivního polymeru. Bylo zjištěno, že fyzikálně-chemické vlastnosti obou konjugátů (obsahy proteinu v konjugátu, molekulové hmotnosti) i biologická aktivita při léčbě lidského melanomu v nu-nu myších (Obr. 3) je podobná. Syntéza využívající reaktivního polymeru podle vynálezu probíhala rychleji, pro dosažení stejného produktu stačilo použít polymer s menším obsahem reaktivních skupin (2 % mol) a ve výsledném konjugátu nebyl přítomen nemodifikovaný protein ani nezreagovaný polymer (výtěžek reakce reaktivních skupin byl větší).

#### Příklad 9

Příprava hvězdicového konjugátu kopolymeru HPMA s RNázou A

Hvězdicový konjugát poly(HPMA) s RNázou A byl připraven ze semitelechelického polymeru připraveného podle příkladu 3 stejným postupem jako při syntéze vycházející z poly(HPMA) s koncovou sukcinimidovou reaktivní skupinou [3]. Hvězdicový konjugát byl čištěn od nízkomolekulárních látek pomocí preparativní gelové chromatografie (Sephacryl S300, kolona 26x600mm, průtok 12.5 ml/h, destilovaná voda). Po zahuštění na ultrafiltrační membráně (PM

30) byl produkt lyofilizován. Při porovnání syntézy konjugátu pomocí polymerního OSu a TT esteru, syntéza pomocí TT esteru vedla k většímu výtěžku reakce a mnohem menšímu podílu nezreagovaného (hydrolyzovaného) polymeru v reakční směsi. Výsledný konjugát byl účinný v in vivo podmínkách stejně jako konjugát připravený z reaktivního OSu esteru (Obr 3).

#### Příklad 10

In vitro aktivita (cytotoxicita) polymerních doxorubicinových kancerostatik

In vitro testy cytotoxicity byly prováděny standardní metodou [4] na ConA stimulovaných a nestimulovaných myších T-splenocytech a na nádorové linii myšího T-buněčného lymfomu EL-4. Cytotoxicita byla sledována pomocí změny zabudování [ $^3\text{H}$ ]-thymidinu do buněk inkubovaných v médiu obsahujícím testovaný vzorek o různých koncentracích. Cytotoxicita byla vyjádřena faktorem  $\text{IC}_{50}$  (koncentrace látky, při které dochází k 50 % poklesu proliferace testovaných buněk). Ukázka výsledků testů je uvedena v tabulce 1. Výsledky ukázaly, že vlastnosti konjugátů připravených jednodušší a levnější metodou dle vynálezu jsou ve shodě s vlastnostmi konjugátů připravených náročnější klasickou metodou.

Tabulka 1

Porovnání cytotoxicity polymerních Dox kancerostatik připravených z thiazolidin-2-thionových (TT) a klasických 4-nitrofenylových (ONp) polymerů .

Konjugát	Splenocyty (ConA) $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	EL-4 $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Dox	0,07	0,03
P-Gly-DL-PheLeuGly-Dox (TT)	$\geq 8,00$	$\geq 8,00$
P-Gly-DL-PheLeuGly-Dox (ONp)	21,5	19,1
P-Gly-DL-PheLeuGly-Dox(hIgG) (TT)	$\geq 8,00$	$\geq 8,00$
P-Gly-DL-PheLeuGly-Dox(hIgG) (ONp)	$\sim 8,00$	11,8
P-Gly-L-PheLeuGly-Dox(hIgG) (TT)	$\geq 8,00$	$\geq 8,00$



### Příklad 11

#### Porovnání in vivo aktivity polymerních Dox cytostatik připravených z TT a ONp polymerů

In vivo testy byly prováděny na myších kmene C57BL/10 s inokulovanými buňkami myšího T-buněčného lymfomu EL4. Nádorové buňky ( $10^5$ ) byly podány subkutánně (s.c.) do pravé dolní poloviny dorzální strany myši v den 0. Léčivo (polymerní cytostatikum s GlyPheLeuGly sekvencí) bylo podáno v terapeutickém režimu (podání léčiva v dávce 5 mg/kg ve dnech 10, 2, 14, 16 a 18 po inokulaci). Byl sledován růst nádoru a přežívání testovaných zvířat. Příklad výsledků je uveden na Obr. 4. Bylo prokázáno, že v in vivo podmínkách je účinnost obou polymerních cytostatik, klasického připraveného z ONp polymeru a léčiva připraveného novou metodou přes TT polymery, shodná. Léčba polymerními cytostatiky byla podstatně účinnější, nežli klasická léčba komerčním doxorubicinem.

### Příklad 12

#### Povrchová modifikace polyelektrolytového komplexu DNA plasmidu (polyplexu) hydrofilním polymerem.

Polyelektrolytový komplex polykationtu polylysinu s DNA (nebo specifickým plasmidem) pLL/DNA připravený podle [25] byl povrchově modifikován reaktivním polymerem o struktuře II i o struktuře III. Polymerní komplex pLL/DNA připravený při poměru nábojů +/- 2:1 (mol. váha použitého pLL byla 20 000) v HEPES (pH 7,5) o koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  DNA (5 ml) byl smíchán s 200  $\mu\text{g}$  polymeru o struktuře II nebo III a reakční směs byla míchána 15 min při pokojové teplotě. K reakční směsi komplexu s polymerem II bylo přidáno, obdobně jako v práci [25], 300  $\mu\text{g}$  pEG-NH<sub>2</sub> modifikovaného biologicky aktivního oligopeptidu (SIKVAVS) a reakční směs byla v obou případech ponechána reagovat přes noc při pokojové teplotě. Nezreagovaný polymer a případný derivát oligopeptidu byly odstraněny z roztoku na zahušťovači Vivaspin 20 (100 000 Da cut-off) a povrchově upravený nesměrovaný i oligopeptidem směrovaný komplex byl použit pro testy jeho stability a biologické aktivity. Bylo ukázáno, že polymerem upravený polymer je podstatně stabilnější jak v roztocích solí, tak i v přítomnosti krevních bílkovin (albumin). Schopnost transfekce DNA in vitro byla zachována.

## Literatura

- [1]. J.Kopeček, P.Rejmanová, J.Strohalm, R.Duncan, J.B.Lloyd, K.Ulbrich, B.Říhová, V.Chytrý, Synthetic polymeric drugs, Czech Patent No. 278551 (Czech PV 0097/85), Austrálie 589587, Canada 130053, Denmark 164485, Europe 0187547, US 5,037,883, Japan 000137/86 (1985)
- [2]. F.Angelucci, M.Grandi, A.Suarato, Biologically active compounds, US 5,571,785 (1996)
- [3]. K.Ulbrich, V.Šubr, J.Strohalm, D.Plocová, M.Jelínková, B.Říhová, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation, J. Controlled Release 64 (2000) 63-79.
- [4]. B.Říhová, M.Jelínková, J.Strohalm, V.Šubr, D.Plocová, O.Hovorka, M.Novák, D.Plundrová, Y.Germano, K.Ulbrich, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules II. Anticancer activity of antibody or (Fab')<sub>2</sub>-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators, J. Controlled Release 64 (2000) 241-261.
- [5]. J.Kopeček, P.Kopečková, T.Minko, Z.R.Lu, HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000) 61-81.
- [6]. K.Ulbrich, J.Strohalm, V.Šubr, D.Plocová, R.Duncan, B.Říhová, Polymeric Conjugates of Drugs and Antibodies for Site-Specific Drug Delivery, Macromol. Symp. 103 (1996) 177-192.
- [7]. P.A.Vasey, R.Duncan, S.B.Kaye, J.Cassidy, Clinical phase I trial of PK1 (HEMA copolymer doxorubicin), Eur. J. Cancer 31 (1995) S193.
- [8]. P.A.Vasey, S.B.Kaye, R.Morrison, C.Twelves, P.Wilson, R.Duncan, A.H.Thomson, L.S.Murray, T.E.Hilditch, T.Murray, S.Burtles, D.Fraier, E.Frigerio, J.Cassidy, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: First member of a new class of chemotherapeutic agents - Drug-polymer conjugates, Clinical Cancer Research 5 (1999) 83-94.

- [9]. P.J.Julyan, L.W.Seymour, D.R.Ferry, S.Daryani, C.M.Boivin, J.Doran, M.David, D.Anderson, C.Christodoulou, A.M.Young, Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine, *J. Controlled Release* 57 (1999) 281-290.
- [10]. A.H.Thomson, P.A.Vasey, L.S.Murray, J.Cassidy, D.Fraier, E.Frigerio, C.Twelves, Population pharmacokinetics in phase I drug development: a phase I study of PK1 in patients with solid tumours, *Br. J. Cancer* 81 (1999) 99-108.
- [11] L.W. Seymour, D.R.Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P.J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A.M. Young, S. Burtles, D.J. Kerr, Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J.Clin. Oncol.* 20 (2002) 1668-1676.
- [12] N.V.R. Panday, M.J.M. Terwogt, W.W. Huinink et al., Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU 166945, a novel water-soluble prodrug of paclitaxel. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17 (1998) 742.
- [13] M.J.M. Terwogt, W.W. Huinink, J.H.M. Schellens, M. Schot, I.A.M. Mandjes, M.G. Zurlo; M. Rocchetti, H. Rosing, F.J. Koopman, J.H.Beijnen: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU 166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 12 (2001) 315-323.
- [14] M. Bouma, B. Nuijen, D.R. Stewart, J.R. Rice, B.A.J. Jansen, J. Reedijk, A. Bult, J.H. Beijnen, Stability and compatibility of the investigational polymer-conjugated platinum anticancer agent AP 5280 in infusion systems and its hemolytic potential. *Anti-Cancer Drugs* 13 (2002) 915-924.
- [15] M.M. Tibben, J.M. Rademaker-Lakhai, J.R. Rice, D.R. Steward, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, Determination of total platinum in plasma and plasma ultrafiltrate, from subjects dosed with the platinum-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer AP5280, by use of graphite-furnace Zeeman atomic-absorption spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 373 (2002) 233-236.

- [16]. B.Říhová, J.Strohalm, K.Kubáčková, M.Jelínková, L.Rozprimová, M.Šírová, D.Plocová, T.Mrkvan, M.Kovář, J.Pokorná, T.Etrych, K.Ulbrich, Drug-HPMA-HuIg conjugates effective against human solid cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.* 519 (2003) 125-143.
- [17]. K.Ulbrich, J.Strohalm, D.Plocová, D.Oupický, V.Šubr, J.Souček, P.Poučková, J.Matoušek, Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine seminal ribonuclease. Synthesis, physicochemical and biological properties, *J. Bioactive Compat. Polym.* 15 (2000) 4-26.
- [18]. J.Souček, P.Poučková, M.Zadinová, D.Hloušková, D.Plocová, J.Strohalm, Z.Hrkál, T.Oleár, K.Ulbrich, Polymer conjugated bovine seminal ribonuclease inhibits growth of solid tumors and development of metastases in mice, *Neoplasma* 48 (2001) 127-132.
- [19]. J.Souček, P.Poučková, J.Strohalm, D.Plocová, D.Hloušková, M.Zadinová, K.Ulbrich, Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) inhibit growth of human melanoma in nude mice, *J. Drug Targeting* 10 (2002) 175-183.
- [20]. B.Říhová, A.Jegorov, J.Strohalm, V.Mařha, P.Rossmann, L.Fornůsek, K.Ulbrich, Antibody-Targeted Cyclosporin A, *J. Controlled Release* 19 (1992) 25-39.
- [21]. K.Ulbrich, V.Šubr, J.Lidický, L.Sedlák, J.Pícha, Polymerní konjugáty lecirelinu s protrahovaným účinkem a jejich použití, *CZ Pat.* 288 568 (2001)
- [22]. K.D.Fisher, Y.Stallwood, N.K.Green, K.Ulbrich, V.Mautner, L.W.Seymour, Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies, *Gene Ther.* 8 (2001) 341-348.
- [23]. J.Drobník, J.Kopeček, J.Labský, P.Rejmanová, J.Exner, V.Saudek, J.Kálal, Enzymatic cleavage of side chains of synthetic water-soluble polymers, *Makromol. Chem.* 177 (1976) 2833-2848.
- [24]. T.Etrych, J.Strohalm, K.Ulbrich, M.Jelínková, B.Říhová, Targeting of Polymer-drug Conjugates with Antibodies. Effect of the Method of Conjugation, 5th International Symposium On Polymer Therapeutics, Cardiff, Great Britain, 2002, Abstracts, p. 65.
- [25]. CH. M. Ward, M. Pechar, D. Oupický, K. Ulbrich, L.W. Seymour, Modification of

17-07-03

**pLL/DNA Complexes with a Multivalent Hydrophilic Polymer Permits Folate-mediated Targeting in vitro and Prolonged Plasma Circulation in vivo. J. Gene Medicine 4 (2002) 536 - 547**

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Reaktivní polymery a kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu pro přípravu polymerních léčiv, modifikaci biologicky aktivních proteinů a přípravu systémů pro dopravu genů, vyznačené tím, že obsahují reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny.
2. Reaktivní polymery a kopolymery podle nároku 1, vyznačené tím, že obsahují reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny na postranních řetězcích polymeru či kopolymeru.
3. Reaktivní polymery a kopolymery podle nároku 1, vyznačené tím, že obsahují reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny na konci polymerního řetězce.
4. Reaktivní kopolymery podle nároku 2, vyznačené tím, že sestávají z 30 až 3000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, z nichž 60 až 99,8 % jednotek je *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a 0,2 až 40 % je reaktivních monomerních jednotek na bázi *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny obecného vzorce Ma-X-TT, kde X je aminokyselina nebo oligopeptid, přičemž aminokyselina je vybraná ze skupiny zahrnující kyselinu  $\epsilon$ -aminokapronovou, kyselinu 4-amino-benzoovou a  $\beta$ -alanin a oligopeptid je vybraný ze skupiny zahrnující GlyGly, GlyPhe, GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, GlyLeuPheGly.
5. Reaktivní polymery podle nároku 3, vyznačené tím, že sestávají z 20 až 150 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného ze 100 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, a nesoucího na konci řetězce sulfanylpropionyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.
6. Reaktivní polymery podle nároku 5, vyznačené tím, že sestávají z 20 až 150 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného z 95 % až 99,90 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a 0,1 až 5 % *N*-methakryloylovaných oligopeptidů doxorubicinu, přičemž oligopeptidy jsou vybrané ze skupiny zahrnující GlyPheGly,

GlyLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyLeuLeuGly, a nesoucího na konci řetězce sulfanylpropionyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.

7. Reaktivní polymery podle nároku 3, vyznačené tím, že sestávají z 20 až 2000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného ze 100 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, a nesoucího na konci řetězce kyanovaleeroyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.
8. Reaktivní polymery podle nároku 7, vyznačené tím, že sestávají z 20 až 2000 monomerních jednotek spojených do polymerního řetězce, složeného z 95 až 99,9 % jednotek *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a 0,1 až 5 % jednotek *N*-methakryloylovaných oligopeptidů doxorubicinu, přičemž oligopeptidy jsou vybrány ze skupiny zahrnující GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a GlyLeuLeuGly, a nesoucího na konci řetězce kyanovaleeroyl-thiazolidin-2-thionovou skupinu.
9. Reaktivní monomerní jednotky na bázi *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů pro přípravu polymerů podle nároku 4, vyznačené tím, že sestávají z *N*-methakryloylovaných aminokyselin nebo oligopeptidů obecného vzorce Ma-X-TT, kde X je aminokyselina nebo oligopeptid, přičemž aminokyselina je vybrána ze skupiny zahrnující kyselinu  $\epsilon$ -aminokapronovou, kyselinu 4-amino-benzoovou a  $\beta$ -alanin a oligopeptid je vybrán ze skupiny zahrnující GlyGly, GlyPhe, GlyPheGly, GlyLeuGly, Gly-L-PheLeuGly, Gly-DL-PheLeuGly, GlyLeuPheGly a kde TT je reaktivní thiazolidin-2-thionová skupina.
10. Způsob přípravy reaktivních polymerů a kopolymerů podle nároku 1, vyznačený tím, že se monomery vybrané ze skupiny, sestávající z *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu a *N*-methakryloylované aminokyseliny nebo oligopeptidu obsahující reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny podrobí radikálové kopolymeraci v roztoku.
11. Způsob přípravy reaktivních polymerů a kopolymerů podle nároku 1, vyznačený tím, že se monomer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid podrobí radikálové srážecí polymeraci za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče či azo-bis-kyanovaleerové kyseliny jako iniciátoru a získaný polymer se nechá zreagovat s 2-thiazolin-2-thiolem.

12. Způsob přípravy reaktivních kopolymerů podle nároků 6 nebo 8, vyznačený tím, že se monomer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid podrobí radikálové roztokové kopolymeraci s *N*-methakryloylovaným oligopeptidem doxorubicinu za přítomnosti 3-sulfanylpropionové kyseliny jako přenašeče či azo-bis-kyanovalekové kyseliny jako iniciátoru a získaný polymer se nechá zreagovat s 2-thiazolin-2-thiolem.
13. Použití reaktivních polymerů podle nároku 1, pro přípravu polymerních konjugátů obsahujících léčivo jako doxorubicin, daunomycin.
14. Použití reaktivních kopolymerů podle nároku 1, pro přípravu konjugátů obsahujících protein jako IgG, hIgG, monoklonální protilátku.
15. Použití reaktivních polymerů podle nároku 1, pro přípravu hydrofilním polymerem modifikovaných ("coated") polymerních komplexů (polyplexů) DNA plasmidů nebo adenovirů jako systémů pro dopravu genů.

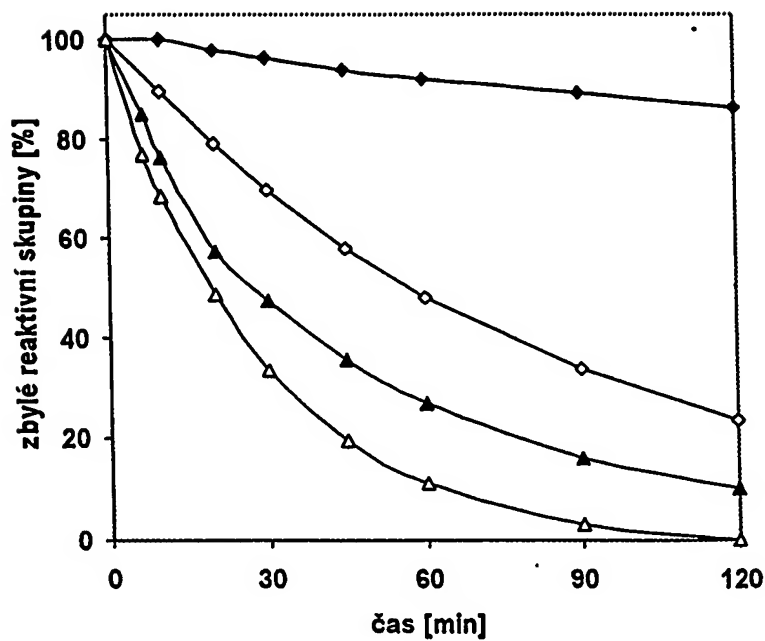


**Anotace**

**Název:** Reaktivní polymery a kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, způsob jejich přípravy a jejich použití pro syntézu polymerních léčiv, pro modifikaci biologicky aktivních proteinů a přípravu systémů pro dopravu genů.

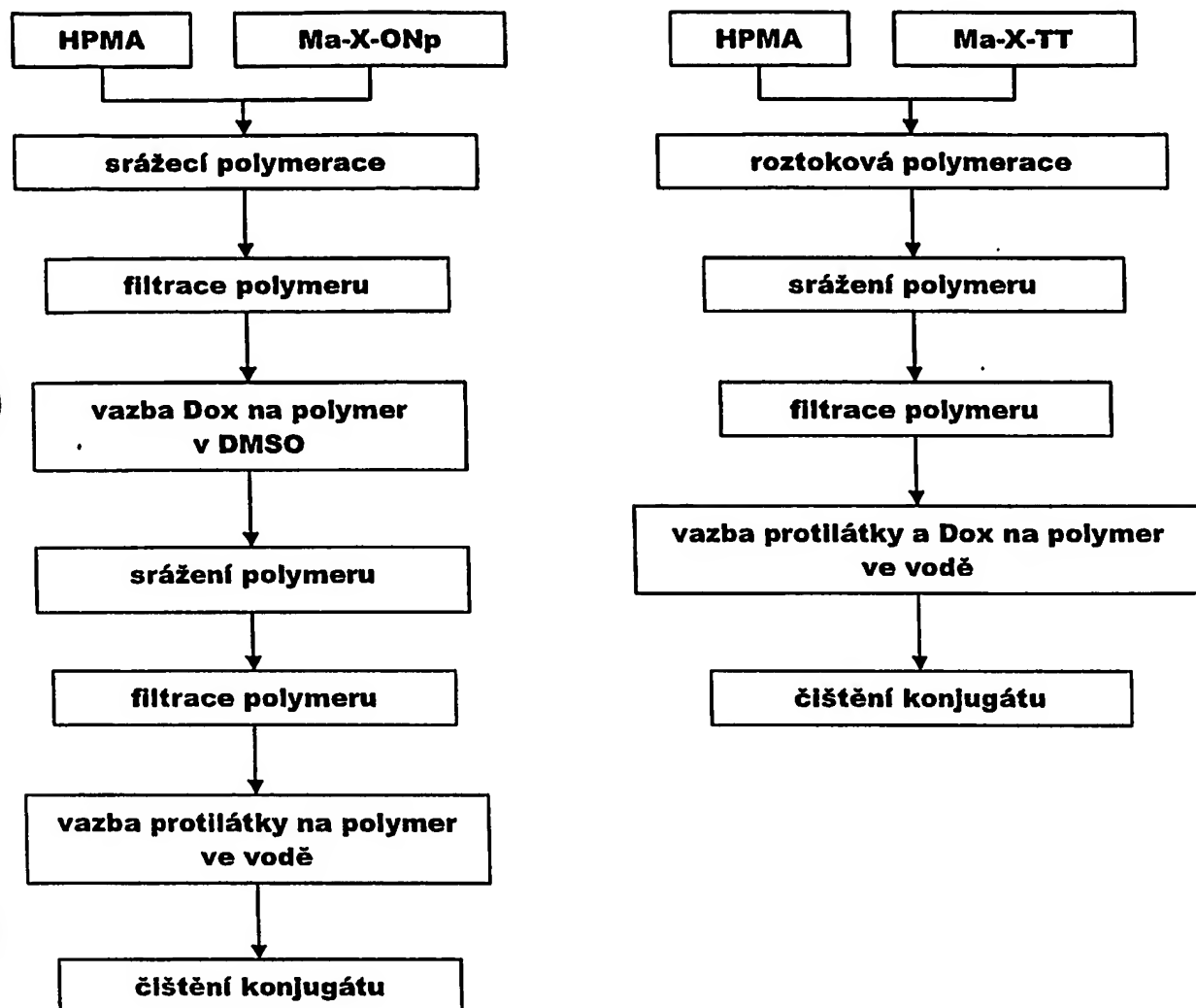
Řešení se týká reaktivních polymerů a kopolymerů na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, které obsahují reaktivní thiazolidin-2-thionové skupiny jež mohou být v postranních řetězcích polymeru nebo na konci polymerního řetězce. Řešení dále zahrnuje způsob jejich přípravy a jejich použití pro syntézu polymerních léčiv a konjugátů s proteiny a přípravu systémů pro dopravu genů.

13.07.03



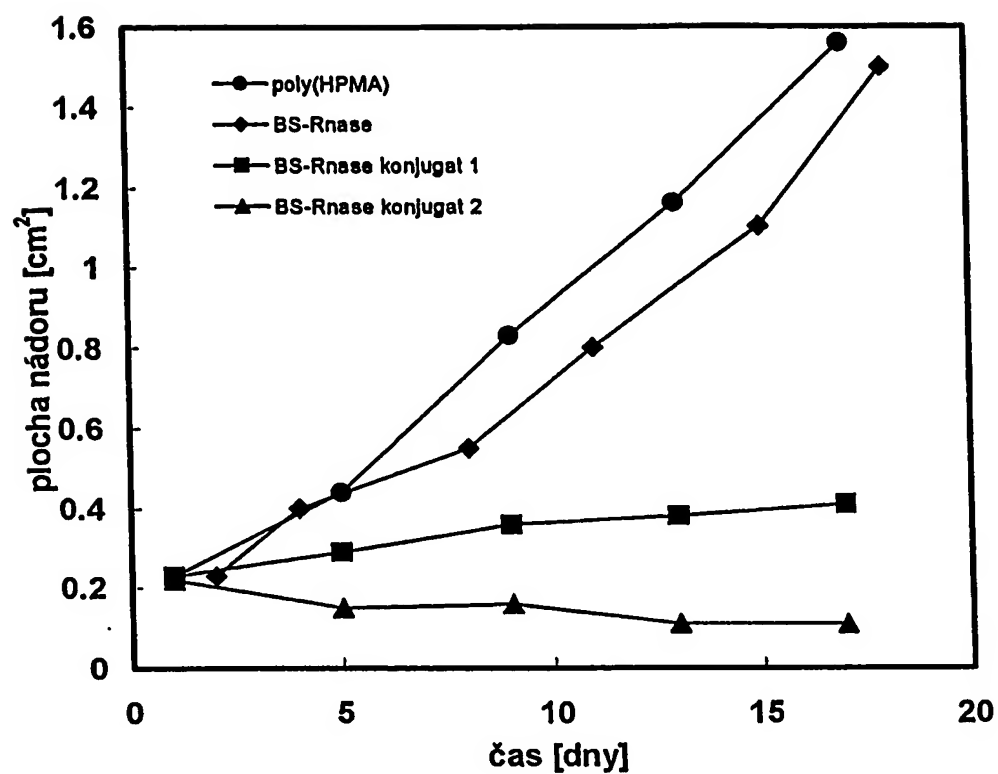
Obr. 1

Porovnání rychlosti hydrolyzy a aminolýzy kopolymerů P-Akap-TT a P-GlyGly-ONp v HEPES pufru při pH 8,0, ♦ P-Akap-TT hydrolyza, ◊ P-Akap-TT aminolýza, ▲ P-GlyGly-ONp hydrolyza, Δ P-GlyGly-ONp aminolýza



Obr. 2

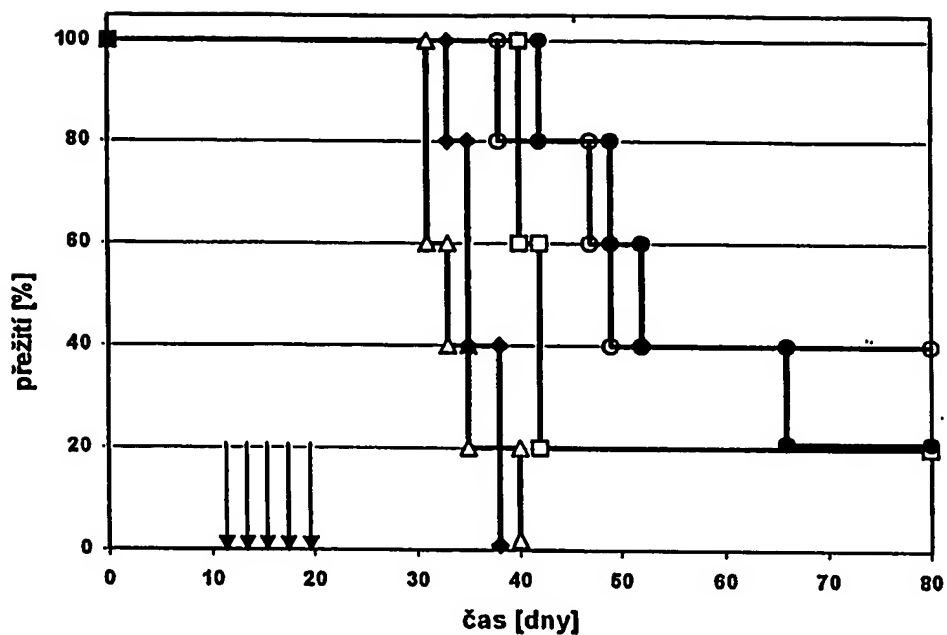
Porovnání syntézy polymerů s TT a ONp skupinami (X je oligopeptidová spojka (spacer) mezi polymerem a léčivem).



Obr. 3

Biologická aktivita klasického (konjugát 1) a hvězdicového BS-Rnase konjugátu (konjugát 2) při léčbě lidského melanomu v nu-nu myších

15.07.2023



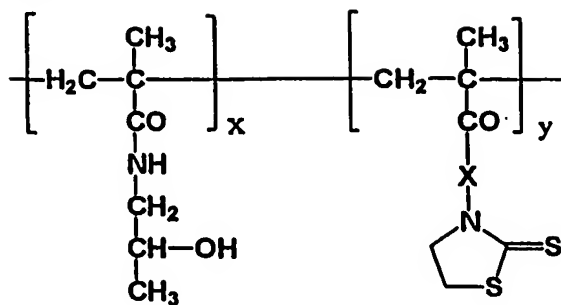
Obr. 4

Doba přežití pokusných myši v terapeutickém modu s konjugáty připravenými podle příkladu 5 a 6

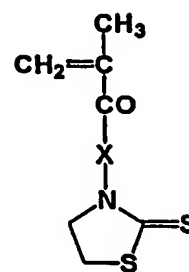
Δ kontrola, ◆ DOX, □ P-Gly-DL-PheLeuGly-DOX

○ P-Gly-DL-PheLeuGly-DOX(hIgG), ● P-Gly-L-PheLeuGly-DOX(hIgG)

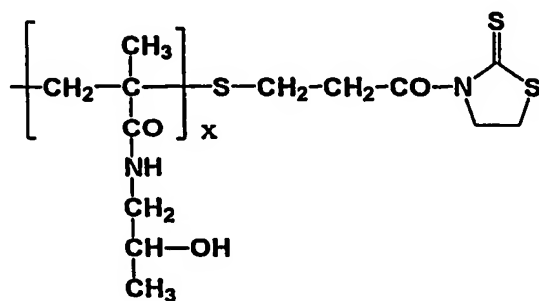
Struktura II



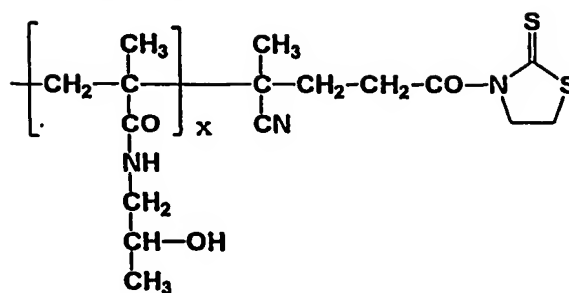
Struktura I



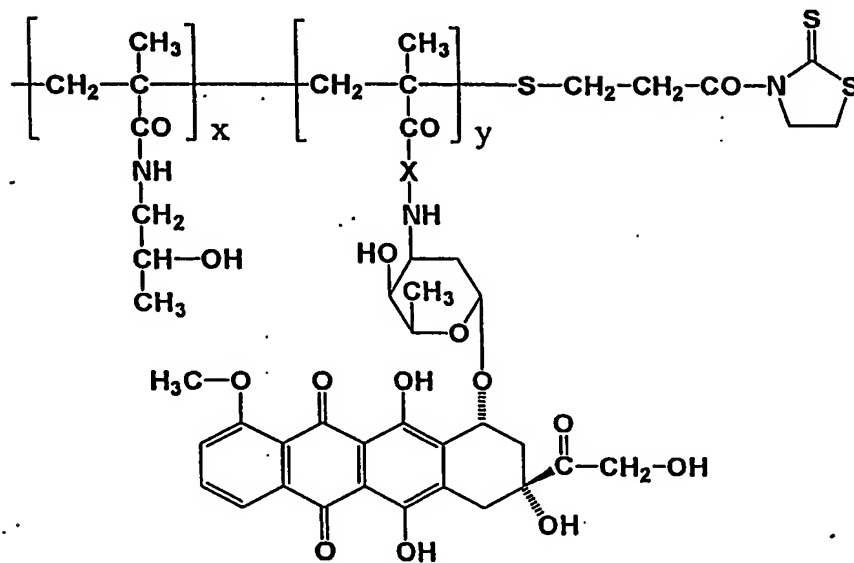
Struktura III



Struktura V

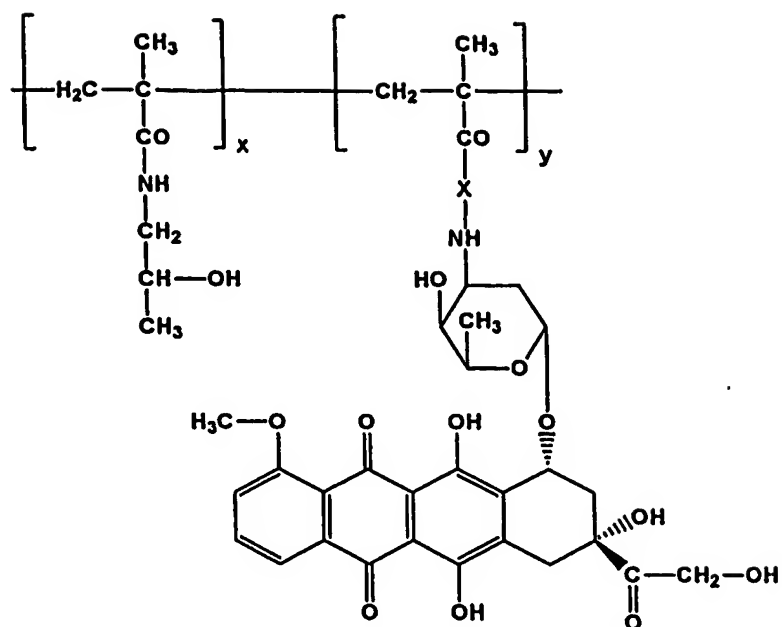


Struktura IV

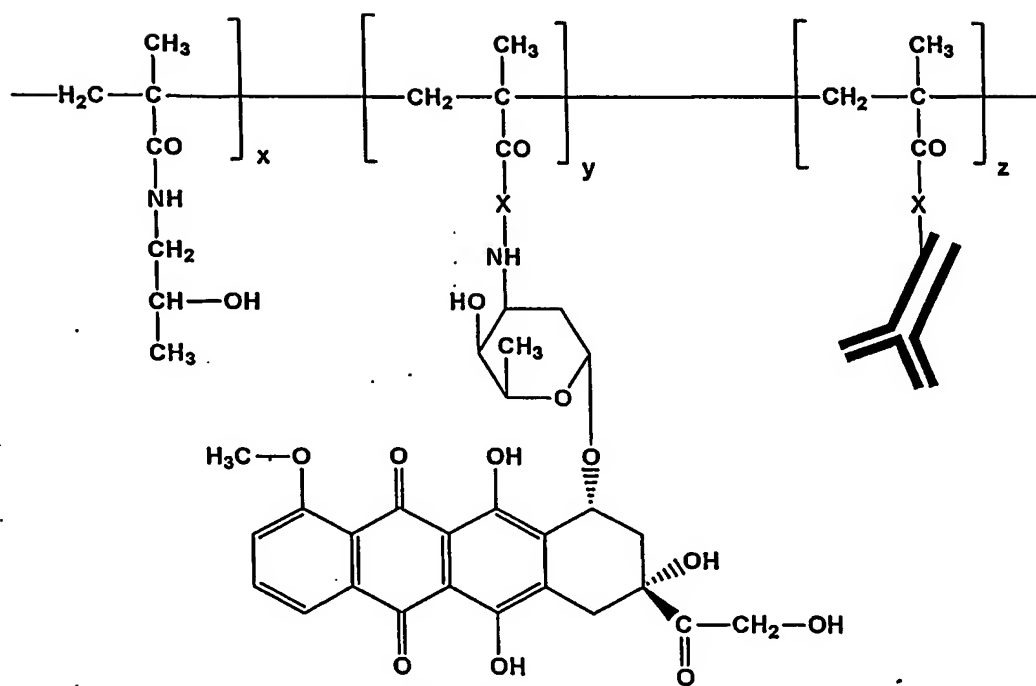


**Obr. 6**

Struktura VII



Struktura VIII



Obr. 7